

AN 113:38931 CA
 TI **Recombinant** manufacture of transglutaminase of Caviidae liver
 (MTGase) with Escherichia
 IN Ikura, Koji; Sasaki, Ryuzo; Chiba, Hideo
 PA Ajinomoto Co., Inc., Japan
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 8 pp.
 CODEN: JKXXAF
 DT Patent
 LA Japanese

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
	-----	----	-----	-----	-----
PI	JP 01300889	A2	19891205	JP 1988-132000	19880530 <--
PRAI	JP 1988-132000		19880530		

AB A method for manufacturing MTGase by cultivating **recombinant** E. coli is described. CDNA for MTGase was cloned from a guinea pig liver cDNA library and subsequently used to construct an expression plasmid pKTG1. The E. coli transformants were cultured and induced to produce MTGase determined by Western blotting. Purification of the **recombinant** MTGase with monoclonal antibody to MTGase by affinity chromatog. was given. The purified MTGase had a sp. activity of 1690 unit/mg + 104.

⑫ 公開特許公報(A) 平1-300889

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成1年(1989)12月5日

C 12 N 1/20
// C 12 N 15/00G-8515-4B
A-8717-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑥ 発明の名称 形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

⑦ 特 願 昭63-132000

⑧ 出 願 昭63(1988)5月30日

特許法第30条第1項適用 昭和63年4月2日 社団法人日本農芸化学会開催の「昭和63年度日本農芸化学会大会」において文書をもって発表

⑨ 発 明 者 伊 倉 宏 司 京都府八幡市八幡山田26-1
⑩ 発 明 者 佐 々 木 隆 造 京都府京都市左京区田中東高原町14
⑪ 発 明 者 千 葉 英 雄 京都府宇治市広野町新成田100-131
⑫ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) モルモット肝トランスグルタミナーゼ(以下MTGaseと略す)をコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物。

(2) 微生物がエシェリヒア・コリである請求項(1)記載の微生物。

(3) 請求項(1)又は(2)項記載の微生物を培地中で培養して目的とするリコンビナントMTGaseを生産させ、該リコンビナントMTGaseを培地中から採取することを特徴とするリコンビナントMTGaseの製造法。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

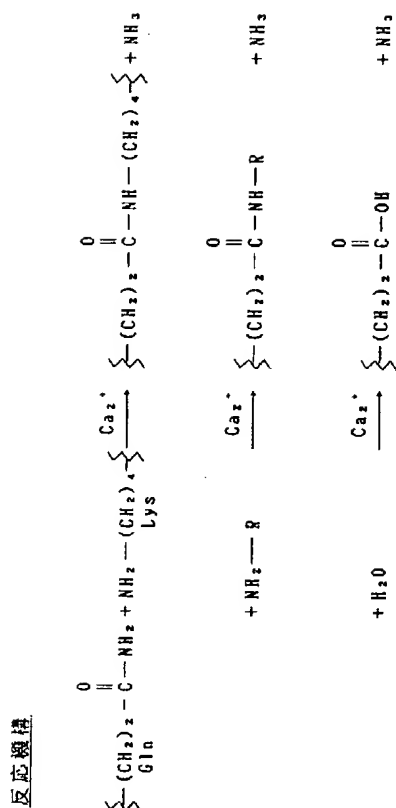
本発明はMTGaseをコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物によるリコンビナントMTGaseの製造法に関する。

る。

<従来技術>

モルモット肝トランスグルタミナーゼ(Protein-glutamine:amine γ -glutamyltransferase, EC2.3.2.13、以下TGaseと略する)はタンパク質の修飾酵素の一つであり、Ca²⁺依存性のアシル転移酵素である。基質としては、アシル供与体としてペプチド鎖中 Gln残基の γ -カルボキシアミド基が、アシル受容体としてアミン化合物の第1級アミノ基やペプチド鎖中 Lys残基の ϵ -アミノ基がそれぞれ反応する。

尚、反応機構は以下のとおりである。



即ち、この酵素が触媒する反応としては、ペプチド鎖中 Gln 残基とペプチド鎖中 Lys 残基との間での ϵ - (γ - グルタミル) リジン架橋結合の形成、ペプチド鎖中 Gln 残基へのアミン化合物の導入、あるいはアミン化合物非存在下でのペプチド鎖中 Gln 残基の脱アミド反応である。

この TGase は多くの動物の様々な部位で見つけられているが、この生理機能として知られているものはほとんどがタンパク質間架橋形成反応であり、血液凝固カスケード反応の最終ステップであるフィブリンモノマーの架橋重合による安定化、表皮組織の角質層における不溶性タンパク質の形成、毛タンパクの架橋形成、などである。

TGase を利用すれば、蛋白質の生化学的研究、新しい酵素反応系の形成や、再利用可能な補酵素誘導体-カゼイン複合体の形成、さらには必須アミノ酸を導入することによって食品蛋白質の栄養価を改善することができ、従って大量入手する方法の開発が望まれている。

さて、現在 TGase を利用するにあたって良質な

酵素の給源としてモルモットの肝臓の TGase (以下 MTGase と略する) が用いられている。

しかしながら、MTGase は質的には良好であるが、モルモット肝臓が供給源であることより取得できる量が限られていること、及び精製法が非常に複雑で収率が極めて悪いこと、更にはモルモット自体が非常に高価であることなどの欠点がある。従って、以前より MTGase を大量に、しかも安価に更には簡便に生産する方法の提供が望まれていた。

< 本発明が解決しようとする課題 >

本発明が解決しようとする課題は、遺伝子工学的手法を用いて、微生物から大量に目的とするリコンビナント MTGase を生産する方法の提供にある。

< 本発明の課題を解決する為の手段 >

本発明者等は上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、MTGase をコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物を培養することにより、目的とするリコンビナント MTGase を多量に生産せしめることができ、本発明を完成に至らしめた。

即ち、本発明は、MTGase をコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物によるリコンビナント MTGase の製造法である。

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明者等は既に MTGase の部分重複 cDNA クローンを複数個取得しており (第 1 図参)、これから MTGase をコードする DNA 配列及び MTGase のアミノ酸配列を決定している (Agric. Biol. Chem. 51(3), 957-961 頁 (1987 年)) これによると、MTGase をコードする DNA は、開始コドン (ATG) と 690 残基のアミノ酸からなるコドンを含むものである (第 2 図参)。また本酵素の分子量は 76,620 と算定されている。さて、MTGase を生産する微生物の調製であるが、まず、MTGase をコードする遺伝子を微生物内で複製可能なプラスミドに組み込む。この時、MTGase をコードする遺伝子を発現ベクターのプロモーター配列下流に挿入すればよい。

組み込む方法は、プラスミドを適当な制限酵素で切断し、その切断部位に目的とする MTGase をコ

ードする遺伝子を挿入し、接続すればよい。このようにして得られた組み換えDNAを原核生物宿主に導入し、得られた形質転換微生物の中からMTGaseを生産する株を選べば良い。本発明において、組み換えDNAが導入される微生物宿主としてはエシェリヒア・コリ、バチルス・ズブチリス等を用いることができるが、好ましくはエシェリヒア・コリを用いるのが良い。

また、本発明に用いることができるエシェリヒア・コリ用ベクターとしてはEKタイププラスミドベクター（リラックス型）、EKタイププラスミドベクター（ストリンジェント型）、 λ gt10タイプファージベクター等々の種々のベクターを用いることができる。

またプロモーターとしてはtrpプロモーター、lacプロモーターを初めとするエシェリヒア・コリ中で機能するすべてのプロモーターが利用可能である。

組み換えDNAを用いた宿主細胞の形質転換には、通常よく用いられる次の方法がある。エシェリヒ

ア・コリの如き原核生物が宿主の場合、このDNAを取り込むことの出来るコンピテント細胞は対数増殖期における細胞を回収後、良く知られているCaCl₂法によって形質転換できる。形質転換反応液中にMgCl₂又はRbClを共存させれば形質転換効率は向上する。また宿主細胞のプロトプラスト調製後形質転換させることも可能である。

形質転換された微生物を培養する培地および培養方法は通常の培地、方法でよい。すなわち培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。

炭素源としてはグルコース、シュクロース等及びこれらを含有する澱粉加水分解物、糖蜜等が用いられる。窒素源としてアンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。より好ましくはペプトン、トリプトン、肉エキス、酵母エキス等の天然素材なども使われる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ行なえば良い。

培養菌体より、リコンビナントMTGaseを採取するには、通常以下のような方法で行えば良い。

即ち、培養菌体を冷却遠心機等で集菌した後、適当なバッファーに懸濁し、超音波あるいはダイノミルなどで菌体を破碎して抽出液を得る。この菌体抽出液を硫酸沈澱分画法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過法、抗体カラム法などを行ってリコンビナントMTGaseの精製標品が得られるわけである。

〔効果〕

本発明はモルモットの肝臓が供給源である為に①少量しかMTGaseを提供できない、②高価である、③精製操作が非常に煩雑である等の従来法の欠点を解消し得る画期的な方法である。換言すれば、本発明の方法を用いると、大量に、しかも、安く、更に、簡便にMTGaseを提供し得るのである。

このようにして得られたリコンビナントMTGaseは従来の天然型MTGaseと同様に、各種アミノ酸を食品蛋白質に共有結合的に導入することにより、栄養価や物性を改変することができる。また、本

酵素は食品以外の医薬品、化成品への応用も期待できる。

以下、本発明を実施例に従って説明する。

〔実施例1：発現プラスミドpMTG1の構築〕

本発明者等は既にMTGaseの部分重複cDNAのクローン5個を取得しており（第1図参）、またこれを基にDNA配列及びアミノ酸配列を決定している（第2図参）。

さて、まず第1図に示したプラスミドpLTG16を含有するエシェリヒア・コリMC1061（以下、E. coli MC1061とする）及びプラスミドpLTG21を含有するE. coli MC1061より以下の方法に従ってプラスミドpLTG16及びプラスミドpLTG21を抽出した。

即ち、培養液100mLを遠心分離により菌体のみ集め、50mM Tris-HCl、pH7.5の5mLに懸濁し-80℃に凍結後、融解して次にリゾチム（最終濃度、2mg/mL）を加えて0℃で10分間静置し、さらにEDTA（最終濃度0.1M）を加え、0℃で10分間静置する。その後、Triton X

-100 (最終濃度0.1%)を加えて0℃で60分間静置する。ついで30,000rpm、30分間遠心分離し、その上清液を等量の水飽和フェノールで処理する。その水層をさらに等量のクロロホルムで処理し、その水層を抽出し、これに最終濃度20μg/mlとなるようにRNaseを加え、37℃で60分間インキュベートした。

その後0.2容の5M NaClと1/3容のポリエチレングリコールを加え、0℃に60分間静置後、10,000rpm 20分間、遠心分離によりDNA沈殿を回収する。

次にこの沈殿を3.8 mlの水に溶解し、4gのCsClを加えて溶解後、10mg/mlのEtBrの200μlを加えて40,000rpm、16時間、20℃で超遠心分離を行う。

遠心終了後、プラスミドDNA画分を抽出し、水飽和n-ブタノールの1~2容で4回抽出操作を行ってEtBrを除く。その後H₂O中で透析を行ってCsClを除去後、3M酢酸ソーダpH5.6の1/10容を加え、さらに2容の冷エタノールを加えて、

1621Aを調製した。

ii) プラスミド pLTG 1621B の構築

(イ) 上記 i) で得たプラスミド pLTG1621A を制限酵素 Sal I 及び Hind III で切断し、アガロース電気泳動分画により小さいDNA断片(約1440 bp)を回収した。

(ロ) プラスミド pLTG 21 を制限酵素 Hind III 及び EcoRI で切断し、アガロース電気泳動分画により、小さいDNA断片(約740 bp)を回収した。

(ハ) プラスミド pUC 9 (ファルマシア社製)を制限酵素 Sal I 及び EcoRI で切断し、アガロース電気泳動分画により、大きなDNA断片を回収した。

(ニ) 上記 (イ), (ロ), (ハ) で得たDNA断片をDNAリガーゼで連結させて、プラスミド pLTG1621B を構築した。

iii) プラスミド pUTG I の構築

(イ) 上記 ii) で得たプラスミド pLTG1621B を制限酵素 Nco I 及び BstE II で切断し、アガロース

-20℃で一晩静置する。このエタノール沈殿を遠心分離で集めて80%エタノール水溶液で洗浄後、よく乾燥し、この沈殿物を50μlの1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.5に溶解しサンプルとした。

プラスミド pLTG 16 及び プラスミド pLTG 21 より HTCase 発現 プラスミド pKTC 1 を構築した (第3及び4図)。以下に、その詳細を示した。

i) プラスミド pLTG 1621A の構築

(イ) さて、プラスミド pLTG 16 を制限酵素 Bsm I、Hind III で切断し、アガロースゲル電気泳動分画により大きい方のDNA断片を回収した。尚第3図及び第4図において制限酵素で切断したDNA断片の内、使用したDNA断片は破線で示した。

(ロ) プラスミド pLTG 21 を制限酵素 Bsm I 及び Hind III で切断し、アガロースゲル電気泳動分画により、約740 bpのDNA断片を回収した。

(ハ) 上記 (イ) 及び (ロ) で得たDNA断片をDNAリガーゼを用いて連結させ、プラスミド pLTG

ス電気泳動分画により約370 bpのDNA断片を回収した。

(ロ) 上記 ii) で得たプラスミド pLTG1621B を制限酵素 BstE II 及び Sal I で切断し、アガロース電気泳動分画により小さい方のDNA断片(約1700bp)を回収した。

(ハ) プラスミド pUC 118N (京大、ウイルス研牧先生より分譲された)を制限酵素、Nco I 及び Sal I で切断し、アガロース電気泳動分画により、大きい方のDNA断片を回収した。

(ニ) 前記 (イ), (ロ), (ハ) で得たDNA断片をDNAリガーゼにより連結させてプラスミド pUTG I を構築した。

iv) プラスミド pKTC 1 の構築

(イ) 上記 iii) で得たプラスミド pUTG I を制限酵素 Nco I 及び BstE II で切断し、アガロース電気泳動分画により約370 bpのDNA断片を回収した。

(ロ) 上記 iii) で得たプラスミド pUTG I を制限酵素 BstE II 及び Pst I で切断し、アガロース電

電気泳動分画により小さい方のDNA断片(約1700 bp)を回収した。

(ハ) trc プロモーター (trpプロモーター及び lac プロモーターの融合したもの) 及びアンピシリン抵抗性を有するプラスミドpKK233-2(ファルマシア社製)を制限酵素 Nco I 及び Pst I で切断し、アガロース電気泳動分画により、大きな DNA断片を回収した。

(ニ) 上記(イ)、(ロ)、(ハ)で得たDNA断片をDNA リガーゼを用いて連結させてMTGase 発現プラスミドpKMG1を構築した。

即ち、以上の操作を処することにより、2種類の重複するcDNAを有するプラスミドpLTG16及びpLTG21からMTGaseをコードする全DNA配列(開始コドンATGから終止コドンTAAまで)を含有するプラスミドpKMG1を構築したわけである。

(実施例2 大腸菌によるリコンビナントMTGaseの生産)

i) 実施例1で作成した

プラスミドpKMG1を保持するエシェリヒア・コ

リJM103株(FERM P-10008)を50 μ g/ μ lアンピシリンを含む2YT培地(1.6%バクトリプトン、1.0%酵母エキス、1.0%NaCl, pH 6.7)1.0 l中で37℃、12時間培養した。

その後、誘導剤として、イソプロピルチオガラクトシド(IPTG)0.2 μ l添加して5時間培養した。培養菌体を遠心分離により集菌し、0.15M KCl 2 mM EDTA、0.2 mM DTTを含む20 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄した後、同じ緩衝液30 μ lに懸濁した。

この集菌菌体の一部をとり、1% SDSで溶菌し、その抽出液の1部をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。コントロールとして、モルモット肝より精製したMTGase標品及びプラスミドpKK233-2で形質転換されたエシェリヒア・コリJM103株を用いた。

この電気泳動したアクリルアミドゲルをニトロセルロース膜に写しとり、抗MTGase抗体で反応させた後にパーオキシダーゼを結合した2次抗体と反応させた。このウェスタンブロッティングの結果は第5図に示した。

これから分かるようにプラスミドpKMG1を含有するエシェリヒア・コリJM103株(FERM P-10008)は菌体内にリコンビナントMTGaseを生産していた。

ii) 上記i)により菌体内にMTGase蛋白が生産されていることを確認したので、このリコンビナントMTGaseを以下の方法で菌体より抽出した。即ち、上述の懸濁液にソニック処理(20キロサイクル、300秒)を行ない、抽出した。

この抽出液はトランスグルタミナーゼ活性を示した(第6図)。尚、コントロールとして、プラスミドpKK233-2で形質転換したエシェリヒア・コリJM103株より同様の方法で抽出した抽出液を用いた。

第6図より分かるようにMTGaseはCa²⁺依存性酵素であるので、Ca²⁺が存在しないと、たとえFERM P-10008の抽出液であってもトランスグルタミナーゼ活性は示さない。

尚、トランスグルタミナーゼ活性の測定は以下の方法で行った。

5 mg/ μ l アセチル α_1 -カゼイン、0.13 mM

(3 H) ブトレシン、50 mMトリス-塩酸(pH 7.5)、5 mM CaCl₂、1.0 mM DTTおよび抽出液を含む反応液(150 μ l)を37℃でインキュベートし一定時間ごとに一定量の反応液(20 μ l)をペーパーディスク上でスポットする。未反応の(3 H)ブトレシンをトリクロール酢酸で洗浄した後に、ペーパーディスク上に固着したアセチル α_1 -カゼインに取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで測定した。

(L. Lorand et al.: Anal. Biochem., 50, 623-631 (1972))に基本的にしたがっている。

(実施例3 モノクロナール抗体カラムによるリコンビナントMTGaseの精製)

実施例2 ii)で得た抽出液30 μ lを抗MTGaseモノクロナール抗体カラム(1.4 cm \times 6 cm)にアブライした。

TBS バッファー(20 mMトリス-塩酸(pH 7.5)、0.15 M KCl、0.2 mM DTT、2 mM EDTA)100 μ lで洗浄した後、溶出バッファー(20 mM NaHCO₃

-NaOH (pH 10.4)、0.4 mM DTT、2 mM EDTA、2 M KCl) 40 ml で目的とするリコンビナント MTGase を溶出した。

溶出液を 20 ml のカウンターバッファー (1 M トリス-塩酸 (pH 7.5)、0.4 mM DTT、2 mM EDTA) で中和した。

その後、限外濾過処理を行うことにより、精製リコンビナント MTGase を得た。

確認の為に SDS-PAGE を行ったところ均一なバンドが得られた。この単離したリコンビナント MTGase のトランスグルタミナーゼ活性を測定すると、その比活性は 1690 ユニット/mg × 10⁴ であった。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、MTGase cDNA の翻訳領域及び、各遺伝子領域を含むクローンを示す。

第 2 図は MTGase のアミノ酸配列及び MTGase をコードする DNA 配列を示す。

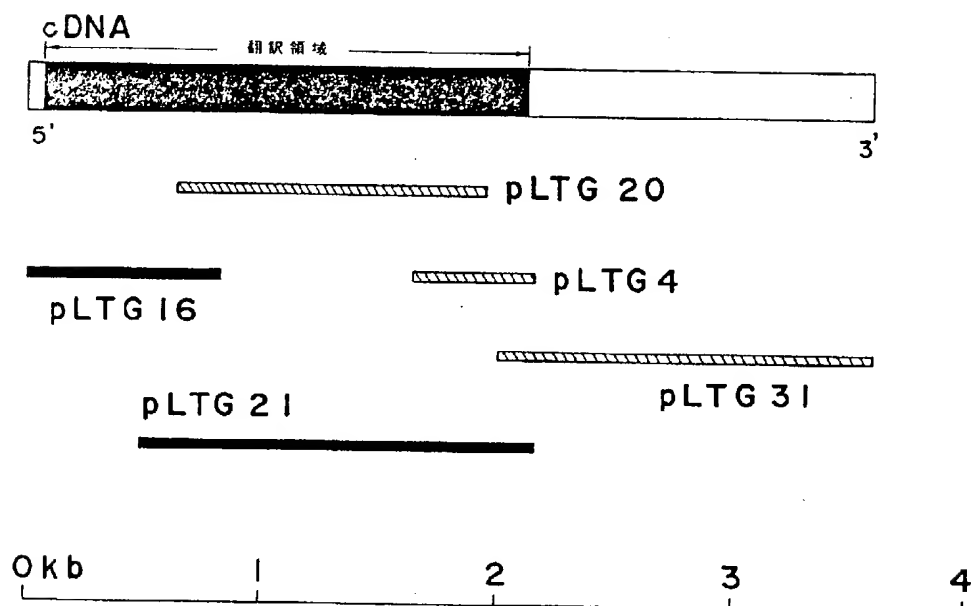
第 3 図はプラスミド pLTG1621B の構築図を示す。

第 4 図はプラスミド pKMG1 の構築図を示す。

第 5 図はプラスミド pKMG1 により形質転換させたエシェリヒア・コリ JM103 株 (FERM P-10008) のウェスタンブロッティングを示す。

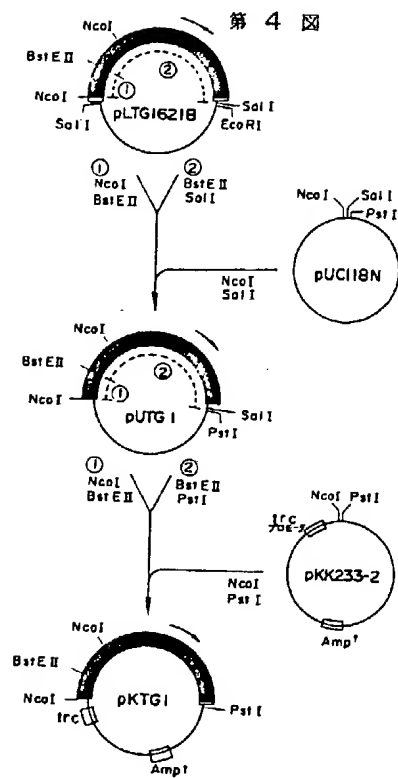
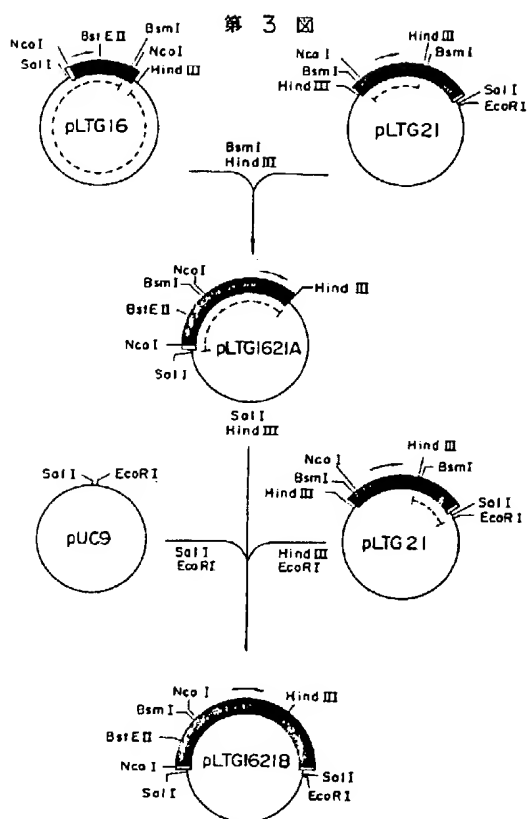
第 6 図は培養した FERM P-10008 抽出液のトランスグルタミナーゼ活性を示す。

第 1 図



第 2 圖

[illegible]



第 6 题

第 5 図

